

*Ministerio de Economía
y Obras y Servicios Públicos
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial*

CERTIFICADO DE DEPOSITO

ACTA N° P 02 01 04287

El Comisario de la Administración Nacional de Patentes, certifica que con fecha 8 de NOVIEMBRE de 2002 se presentó a nombre de JUAN BAUTISTA MARIO LUCIO MAGRI, con domicilio en la provincia de RIO NEGRO, REPUBLICA ARGENTINA.

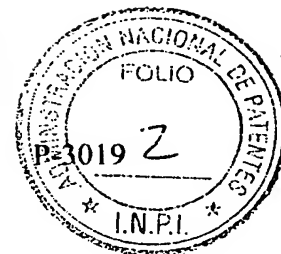
una solicitud de Patente de Invención relativa a: "UN METODO PARA LA PREPARACION DE UN INOCULANTE CONCENTRADO Y COMPOSICION INOCULANTE CONCENTRADA OBTENIDA CON DICHO METODO".

cuya descripción y dibujos adjuntos son copia fiel de la documentación depositada en el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

Se certifica que lo anexado a continuación en fojas DIECIOCHO es copia fiel de los registros de la Administración Nacional de Patentes de la República Argentina de los documentos de la solicitud de Patentes de Invención precedentemente identificada.

APEDIDO DEL SOLICITANTE Y DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN LA CONVENCION DE PARIS (LISBOA 1958), APROBADO POR LEY 17.011, EXPIDO LA PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, A LOS DIECISEIS DIAS DEL MES DE DICIEMBRE DE 2002.


Dr. EDUARDO R. ARIAS
SUBCOMISARIO
Administración Nacional de Patentes



MEMORIA DESCRIPTIVA DE LA PATENTE DE INVENCION

Por el término de
VEINTE AÑOS

Sobre: *Un método para la preparación de un inoculante concentrado y composición inoculante concentrada obtenida con dicho método.*

Solicitada por:

JUAN BAUTISTA MARIO LUCIO MAGRI

Con domicilio en:

Calle Rivadavia N° 2.622, El Bolsón, (8430), Provincia de Río Negro,

ARGENTINA



La presente invención se refiere a un método para la preparación de una composición inoculante concentrada para leguminosas, preferentemente soja, alfalfa y porotos, y a la composición inoculante obtenida con tal método.

Es conocido en el arte que las plantas leguminosas bajo determinadas condiciones fijan el nitrógeno directamente desde el aire y lo convierten a determinados compuestos nitrogenados orgánicos, y así proporcionan nitrógeno a la planta para la síntesis proteica y enriquecen también al suelo, dejando también nutrientes nitrogenados para cultivos posteriores. El causante de esta fijación es la bacteria denominada *Rhizobium Japonicum* o *Bradyrhizobium Japonicum*, que coexiste simbióticamente con la planta formando nódulos infectivos en el cuello de la raíz. Cuando más nódulos infectivos tiene el cuello de la raíz de la planta, se logra una mayor fijación de nitrógeno, y de esta manera contando los nódulos se puede cuantificar la eficiencia del inoculante usado. Por lo tanto la mayor fijación de nitrógeno se logra con los inoculantes que más bacterias *Bradyrhizobium* contienen y sobre todo el grado de infectividad de las mismas.

Los inoculantes en sí fueron modificados en sus características desde substratos sólidos como la turba, vermiculita, perlita,

carbón vegetal, etc., como portadores del Bradyrhizobium, a líquidos como la mayoría de los que se encuentran actualmente en el mercado.



Desde la aparición de los inoculantes líquidos el primer problema a solucionar fue lograr una mayor supervivencia de la bacteria Bradyrhizobium —ya que a mayor supervivencia de la misma en el inoculante, mayor era el período de efectividad del inoculante—, habiéndose comenzado con un inoculante cuya viabilidad fue, en un principio, de un mes, y lográndose en la actualidad que la mayoría sea tanto de dieciocho meses como algunos de dos años de viabilidad.

La ventaja de los inoculantes líquidos resultó ser la mayor cantidad de bacterias que contienen $\pm 1,00 \times 10^{10}$ de bacterias Bradyrhizobium por mililitro y la practicidad de su uso. Por otro lado, presentaron como desventaja la mayor fragilidad —y por ende menor viabilidad— de las bacterias Bradyrhizobium que contiene, frente a las agresiones provocadas por productos tales como funguicidas, sequedad del medio ambiente, temperatura, P.H. del suelo, etc.

A fin de dar solución a este problema, se comenzó a —adicionar turba molida, previamente esterilizada y neutralizada, al caldo de cultivo ya elaborado con una concentración de Rhizobium Japonicum de 1

x 10¹⁰, mezcla que se llevaba a cabo con anterioridad al envasado del caldo de cultivo.



La esterilización recién mencionada que se hacía de la turba, se efectuaba preferentemente con agua a 121° C durante 30 minutos. A su vez, la neutralización de la misma se hacía con carbonato de calcio.

Si bien con el agregado al inoculante de turba molida, previamente esterilizada y neutralizada al caldo de cultivo ya elaborado con una concentración de *Rhizobium Japonicum* de 1×10^{10} , se logró mejorar la viabilidad de la bacteria *Rhizobium Japonicum* ante las agresiones mencionadas, manifestándose en una mejor nodulación, la acidez misma de la turba y el distinto P.H. de la misma frente al del medio al cual se incorporaba no permitía una absorción óptima de bacterias *Rhizobium Japonicum*, resultados que fueron ampliamente superados con la invención que se pretende patentar, la cual viene a solucionar este problema, logrando una mayor protección, resistencia y viabilidad de las bacterias *Rhizobium Japonicum* frente a las agresiones descriptas precedentemente, y logrando una multiplicación mayor de las bacterias *Rhizobium Japonicum* que se encuentran contenidas en la turba, tal como se expondrá en esta memoria descriptiva.



Para ello, al caldo de cultivo que forma la composición inoculante concentrada se le adicionaron los sacáridos maltosa en polvo, maltosa líquida y lactosa, así como un fungicida denominado sorbato de potasio, todo lo cual redundó en una mayor viabilidad de la bacteria *Rhizobium Japonicum* frente a la viabilidad que la bacteria tenía sin estos agregados al caldo de cultivo.

A su vez, si al mencionado caldo de cultivo de uso universal se le adicionaba turba simultáneamente con sus otros ingredientes, se logra una mayor resistencia de la bacteria frente a las agresiones mencionadas y una mejor multiplicación de la misma, ya que, se logra una mayor impregnación de la bacteria a la turba que incorporándola una vez que el caldo de cultivo se encuentra terminado, se neutraliza mejor la acidez de la turba, la cual se solidariza con el caldo de cultivo tomando el mismo P.H. de éste, adquiriendo una mayor capacidad de absorción de bacterias, ya que con la temperatura de estabilización la turba se vuelve más esponjosa, lográndose una mayor porosidad de la misma, y en virtud de ello, una mayor interacción con la bacteria.

El objeto de la presente invención se refiere a un método para preparar una composición inoculante concentrada, que contiene caldo de cultivo de uso universal, al cual, luego de ser esterilizado y enfriado, se

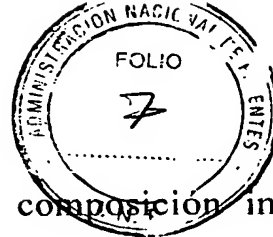


5



le agrega la bacteria *Rhizobium Japonicum*, la cual se multiplica durante aproximadamente 46 horas a 28° C, para luego enfriar el caldo de cultivo al cual se agregó hasta que éste alcance una temperatura de 10 a 11° C, y que se caracteriza porque una vez cumplidos estos pasos mentados, se procede a agregar al caldo de cultivo los sacárido maltosa en polvo, maltosa líquida y lactosa, así también como un funguicida denominado sorbato de potasio, todo lo cual da como resultado una composición inoculante concentrada industrial y agrícolamente útil para ser usada con leguminosas, preferentemente soja, alfalfa y porotos.

Es también un objeto de la presente invención un método para preparar una composición inoculante concentrada, que contiene caldo de cultivo de uso universal, al cual luego de ser esterilizado y enfriado se le agrega la bacteria *Rhizobium Japonicum*, al cual se multiplica durante aproximadamente 46 horas a 28° C, dejándose luego enfriar el caldo de cultivo al cual se agregó hasta que éste alcance una temperatura de 10 a 11° C, la cual se caracteriza porque al caldo de cultivo de uso universal mencionado se le agrega, durante su elaboración turba tratada como uno de sus componentes, y debido a que una vez cumplidos estos pasos descriptos, se procede a agregar al inoculante los sacárido maltosa en polvo, maltosa líquida y lactosa, así también como un funguicida denominado sorbato de



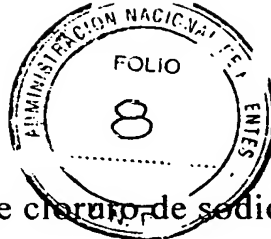
potasio, todo lo cual da como resultado una composición inoculante concentrada con turba incorporada inicialmente como un ingrediente más del caldo de cultivo que el inoculante contiene, industrial y agrícolamente útil para ser usada con leguminosas, preferentemente soja, alfalfa y porotos.

Es un objeto ulterior de la presente invención la composición inoculante concentrada elaborada de acuerdo con los dos métodos recién descriptos.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención, serán más evidentes por la siguiente descripción detallada, cuyos ejemplos no limitativos solamente están destinados a ilustrar la presente invención.

La presente invención describe un método industrial para preparar una sustancia inoculante concentrada con o sin turba incorporada como parte del caldo de cultivo, agrícolamente útil, práctico y eficiente sobre todo cuando se lo mezcla con funguicidas, y al inoculante resultante del mismo.

El caldo de cultivo al que nos referimos a lo largo de toda esta memoria descriptiva es un caldo de cultivo de uso universal, compuesto cada 1000 litros preferentemente por 500 gr. de fosfato de potasio, 300 gr. de fosfato de amonio, 200 gr. de sulfato de magnesio



7



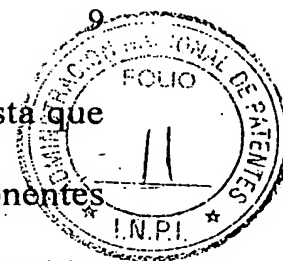
heptahidrato, 800 gr. de nitrato de potasio, 100gr. de cloruro de sodio, 12 Kg. de glicerina, 4kg. de extracto de levadura, 100 ml. de cloruro férrico al 10 % y 200 ml. de antiespumante.

Una modo preferente de llevar a cabo la presente invención consiste en un método para preparar una composición inoculante concentrada, cuyo caldo de cultivo de uso universal se esteriliza y se enfría, para luego inyectarle la bacteria *Rhizobium Japonicum*. En este medio de cultivo, al bacteria se multiplica durante aproximadamente 46 horas a una temperatura de 28° C. Luego se enfría el caldo de cultivo ya con la bacteria incorporada hasta la temperatura de 10 u 11° C. Una vez cumplidos estos pasos, se agregan al caldo de cultivo los sacáridos maltosa en polvo por 500 gr., 2 ½ Kg. de maltosa líquida y 500gr. de lactosa; también se agrega 400 gr. de un funguicida denominado sorbato de potasio. Todos estos últimos componentes que se agregan al caldo de cultivo, para ser agregados se los debe disolver en 100 litros de agua, para luego esterilizarlos a 121° C durante 30 minutos, dejando enfriar hasta que alcancen una temperatura de 20° C, para luego trasvasar estos componentes al tanque donde está contenido el caldo de cultivo universalmente conocido. Como resultado de agregar estos componentes tratados en la forma descripta al caldo de cultivo, obtenemos una composición inoculante

concentrada agrícolamente útil, práctica y eficiente sobre todo cuando se la mezcla con funguicidas.



Otra forma de realización de la presente invención consiste en agregar 100 kg. de turba previamente tratada al caldo de cultivo de uso universal como uno de sus componente, agregado que se efectúa simultáneamente con el agregado de las restantes drogas que forman parte del caldo de cultivo de uso universal, que fueron descriptas en esta memoria descriptiva. Para ello, la turba requiere de un tratamiento previo, el cual consiste en calentar la turba con agua destilada a 100° C durante cuarenta minutos, a fin de evaporar los distintos compuestos volátiles de la composición natural de la turba. Luego de ello, se trasvasa aproximadamente el 10% de la turba en volumen final al fermentador donde se va a preparar el caldo de cultivo, donde se adicionan el resto de las drogas mencionadas anteriormente que lo componen, ajustando el P.H. de acuerdo a las normas usuales en el proceso de fermentación de Rizorhibium. A continuación, se agregan al caldo de cultivo los sacáridos maltosa en polvo por 500 gr., 2 ½ Kg. de maltosa líquida y 500gr. de lactosa; también se agrega 400 gr. de un funguicida denominado sorbato de potasio. Todos estos últimos componentes que se agregan al caldo de cultivo, para ser agregados se los debe disolver en 100 litros de agua, para



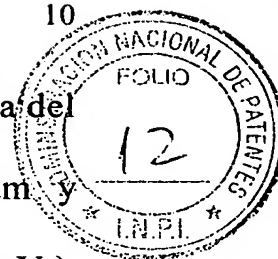
luego esterilizarlos a 121° C durante 30 minutos, dejando enfriar hasta que alcancen una temperatura de 20° C, para luego trasvasar estos componentes al tanque donde está contenido el caldo de cultivo universalmente conocido.

Como resultado de agregar estos componentes tratados en la forma descrita al caldo de cultivo, obtenemos una composición inoculante concentrada agrícolamente útil, práctica y eficiente sobre todo cuando se la mezcla con funguicidas.

La turba previamente tratada debe comprender preferentemente del 5 al 20% del caldo de cultivo.

Los siguientes análisis llevados a cabo en laboratorios ilustrarán los beneficios de la invención en comparación con el estado anterior de la técnica.

Se agrega la bacteria al caldo de cultivo de uso universal, y se mide la viabilidad de la misma, la cual alcanza aproximadamente 40 días de vida. Luego, a 1000 litros del mismo caldo de cultivo de uso universal se le agregan los sacáridos maltosa en polvo por 500 gr., 2 ½ Kg. de maltosa líquida y 500gr. de lactosa; también se agrega 400 gr. de un funguicida denominado sorbato de potasio, lográndose con ello una viabilidad de la bacteria de 18 meses de vida de la misma. La maltosa líquida, así como la maltosa en polvo pueden ser reemplazados por trealosa.



Se efectuó otra prueba mezclando el inoculante con turba del 10 al 20% en su composición con curasemillas 30/30 de Tiram y Carbendazin se deja ocho horas y luego se hace un recuento viable (R.V.). Luego se mezcla con semillas en la proporción de 0,4 gr. para 100 gr. de semilla. Luego se siembra en el laboratorio en la forma universalmente conocida (de acuerdo al método propuesto por el S.E.N.A.S.A.). Al cabo de 21 días se cuenta la nodulación, dando los siguientes resultados, tal como surge del siguiente cuadro I:

	<u>R.V. inicial</u>	<u>R.V. 8 hs</u>	<u>Nodulación</u>
<u>Muestra A:</u> inoculante líquido sin turba + curasemilla	5×10^9	4×10^8	4 nódulos por planta
<u>Muestra B:</u> inoculante líquido con turba + curasemilla	5×10^9	2×10^9	10 nódulos por planta



11



También se comprueba en ensayos realizados con semilla de soja tratada con la proporción indicada de acuerdo a indicación de uso de inoculante líquido + curasemilla e, inoculante líquido con turba en composición + curasemillas.

Se dejan las semillas ocho horas en la estufa de cultivo a temperatura de 38 a 40° C y luego se hace un R.V. en las semillas y nodulación para determinar la sobrevivencia de la bacteria, tal como se ilustra en el siguiente cuadro II:

	<u>Inicial</u>	<u>8 hs.</u>	<u>Nodulación</u>
Muestra A	150.000 bacterias por semillas	50.000 bacterias por semilla	2 nódulos por planta
Muestra B	150.000 bacterias por semillas	90.000 bacterias por semilla	6 nódulos por planta

Los dos cuadros precedentes son el promedio de más de cincuenta análisis efectuados, no conociéndose en la técnica un método de elaboración del producto descrito ni éste mismo, el cual resulta ser el único que tiene turba incorporada al caldo de cultivo como composición del mismo.



Otra prueba se realiza mediante centrifugado del inoculante, para separar en el mismo el sólido (turba) del caldo de cultivo líquido, se la enjuaga con H₂O destilada y estéril, desechando el H₂O de lavado. A continuación se toma 10 gr. de la turba y se procede a realizar el recuento viable y nodulación, dando como resultado los datos del siguiente cuadro III

	<u>R.V.</u>	<u>Nodulación</u>
Turba incorporada al caldo de cultivo terminado	1×10^9	5 nódulos por planta
Turba incorporada al caldo de cultivo simultáneamente con los otros componentes del mismo	9×10^9	12 nódulos por planta

Estos datos surgieron como promedio de más de cincuenta determinaciones realizadas.

Siguen las reivindicaciones en la hoja número trece.



Continuación de la hoja número doce.

REIVINDICACIONES

Descripta que ha sido la naturaleza de la presente invención y La manera de llevarla a la práctica, se declara que lo que se reivindica como de propiedad exclusiva e invención del solicitante es:

1- Método para preparar una composición inoculante concentrada para uso con leguminosas, preferentemente soja, alfalfa y porotos, a base de caldo de cultivo de uso universal esterilizado y enfriado, que comprende los siguientes pasos de tratamiento del caldo de cultivo en el orden en que se exponen:

a) se esteriliza el caldo de cultivo de uso universal y se lo enfría

b) Se coloca la bacteria *Rhizobium Japonicum* en el caldo de cultivo y se la deja multiplicarse durante 46 horas, a una temperatura preferentemente de 28° C

c) Se enfría el resultante de los dos pasos anteriores a una temperatura de 10 u 11°C,

caracterizada porque al caldo de cultivo de uso universal tratado de la forma expuesta se le adicionan los sacáridos maltosa en polvo y maltosa



líquida, así como un fungicida denominado sorbato de potasio, los cuales han sido tratados según los siguientes pasos:

- 1) previamente se los disuelve en 100 litros de agua,
- 2) Se los esteriliza a 121° C durante 30 minutos,
- 3) Se los enfria hasta que alcancen los 20° C.

2- Método para preparar una composición inoculante concentrada según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende además las etapas de incorporar, previo a la etapa a), del 5 al 20% de turba, tratada previamente según los siguientes pasos:

I) calentar la turba con agua destilada a 100° C durante cuarenta minutos

II) trasvasar el 10% de la turba del paso I en volumen final al fermentador donde se va a preparar el caldo de cultivo, donde se adicionan el resto de las drogas que componen un caldo de cultivo de uso universal

III) ajustar el P.H. de acuerdo a normas usuales en el proceso de fermentación de *Rhizobium*.

3- Una composición inoculante concentrada para uso con leguminosas, preferentemente soja, alfalfa y porotos, a base de caldo de cultivo de uso universal, obtenido con el método de la reivindicación 1,



caracterizada porque comprende los sacáridos maltosa en polvo, maltosa líquida, lactosa, así como el funguicida sorbato de potasio.

4- Una composición inoculante concentrada, de acuerdo a la reivindicación 3, **caracterizada** porque comprende del 5 al 20% del mismo, por turba previamente tratada según el método de la reivindicación número dos.

La presente memoria descriptiva consta de quince hojas escritas de un solo lado.

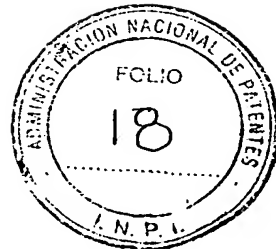
Ciudad de Buenos Aires, Noviembre de 2002.

JUAN BAUTISTA MARIO LUCIO MAGRI



RESUMEN

Un método para preparar una composición inoculante concentrada, que contiene caldo de cultivo universal, el cual se esteriliza y enfría, para agregarle *Rhizobium Japonicum*, la que se deja multiplicar por 46 horas. Luego se le agrega se agrega al caldo de cultivo los sacárido maltosa en polvo, maltosa líquida y lactosa, así como el funguicida sorbato de potasio. El caldo de cultivo de uso universal puede comprender turba previamente tratada como uno de sus componentes, lo cual da como resultado una composición inoculante para uso con leguminosas, con o sin turba incorporada como parte del caldo de cultivo de uso universal.



REIVINDICACION UNO

Método para preparar una composición inoculante concentrada para uso con leguminosas, preferentemente soja, alfalfa y porotos, a base de caldo de cultivo de uso universal esterilizado y enfriado, que comprende los siguientes pasos de tratamiento del caldo de cultivo en el orden en que se exponen:

a) se esteriliza el caldo de cultivo de uso universal y se lo enfría

b) Se coloca la bacteria *Rhizobium Japonicum* en el caldo de cultivo y se la deja multiplicarse durante 46 horas, a una temperatura preferentemente de 28° C

c) Se enfría el resultante de los dos pasos anteriores a una temperatura de 10 u 11° C,

caracterizada porque al caldo de cultivo de uso universal tratado de la forma expuesta se le adicionan los sacáridos maltosa en polvo y maltosa líquida, así como un fungicida denominado sorbato de potasio, los cuales han sido tratados según los siguientes pasos:

- 1) previamente se los disuelve en 100 litros de agua,
- 2) Se los esteriliza a 121° C durante 30 minutos,
- 3) Se los enfría hasta que alcancen los 20° C.